

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Biomarcadores no diagnóstico precoce do carcinoma da próstata

Deniz Özgüler Passos



2018



DISSERTAÇÃO - ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DO
CARCINOMA DA PRÓSTATA**

BIOMARKERS IN EARLY DIAGNOSIS OF PROSTATE CANCER

Deniz Maria Özgüler Passos

Endereço de correio eletrónico: denizmariapassos@gmail.com

Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

ORIENTADOR

Prof. Doutor Avelino Manuel Fraga Ferreira

Assistente graduado sénior de Urologia

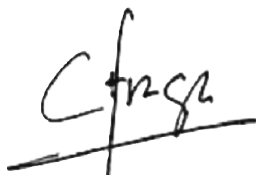
Afiliação: Serviço de Urologia do Centro Hospitalar Universitário do Porto

Porto, maio de 2018

Autora: Deniz Maria Özgüler Passos

Deniz Passos

Orientador: Prof. Doutor Avelino Manuel Fraga Ferreira

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Fraga', with a long horizontal stroke extending to the left.

Data: maio de 2018

RESUMO

O rastreio do carcinoma da próstata parece apresentar benefícios na diminuição da mortalidade específica e das complicações associadas à sua progressão; no entanto, associa-se a malefícios como o sobrediagnóstico e o sobretratamento. Ambos conduzem à realização de procedimentos desnecessários que aumentam os gastos em saúde, assim como a morbilidade em indivíduos que nunca viriam a desenvolver sintomas clínicos associados ao carcinoma da próstata.

Com esta dissertação pretende-se rever os modelos de rastreio aplicados atualmente, benefícios e riscos associados a este, explorar modelos alternativos e a importância do rastreio individualizado. Também serão abordadas as características do antígeno específico da próstata, as suas vantagens e desvantagens e as crenças atuais sobre a sua aplicabilidade no diagnóstico precoce do carcinoma da próstata e possíveis entraves à sua utilização. Finalmente será analisado o potencial de aplicabilidade de biomarcadores alternativos aos PSA. Serão incluídos na revisão tanto biomarcadores aprovados pela 'Food and Drug Administration' como não-aprovados. Esta revisão bibliográfica tem então como objetivo principal a informação de profissionais de saúde, de uma forma sistematizada, sobre a problemática atual do rastreio do carcinoma da próstata e a apresentação de alternativas ao modelo de rastreio atual, contribuindo assim para o estudo e implementação de um possível ajuste no rastreio, de forma a potencialmente diminuir os riscos que lhe estão associados.

O período de seleção de artigos iniciou-se a setembro de 2017, tendo terminado a fevereiro de 2018. O motor de busca utilizado foi o PubMed, onde foram alvo de pesquisa e análise artigos de investigação originais, nomeadamente ensaios clínicos, estudos prospetivos e retrospectivos multicêntricos e estudos comparativos publicados nos últimos 10 anos, relativos a biomarcadores associados ao rastreio do carcinoma da próstata. Foram excluídos artigos de revisão e artigos originais com enfoque em biomarcadores relativos à determinação de prognóstico, seguimento e monitorização do tratamento. Para informação relativa a estratégias de rastreio foram incluídas *guidelines* clínicas.

Ajustes na metodologia do rastreio para o cancro da próstata, nomeadamente na idade de início e fim, frequência da aplicação do antígeno específico da próstata e limiar deste, assim como a aplicação de biomarcadores alternativos com maior sensibilidade e especificidade parecem reduzir substancialmente o sobrediagnóstico e sobretratamento.

Alguns destes biomarcadores ainda não foram introduzidos na prática clínica o que pode advir tanto desconhecimento por parte dos profissionais de saúde como do seu custo. Estudos comparativos futuros sobre os custos associados a cada biomarcador são necessários para avaliar a sua aplicabilidade clínica.

Palavras-chave: Neoplasia prostática; Detecção precoce de cancro; Biomarcadores; Biomarcadores, Tumor.

Key words: Prostatic Neoplasms; Early Detection of Cancer; Biomarkers; Biomarkers, Tumor.

ABSTRACT

Prostate cancer screening seems to show some benefits in the decrease of specific mortality and complications associated with disease progression, however it may also be associated with overdiagnosis and overtreatment. Both lead to the performing of unnecessary procedures that increase health costs and morbidity in individuals that would never develop clinical symptoms associated with prostate cancer.

This dissertation intends to review screening models currently used, the associated benefits and risks, to explore alternative models and the significance of individualized screening. The characteristics of the prostate specific antigen (PSA), including its advantages and disadvantages, current beliefs on its clinical application for the early diagnosis of prostate cancer and limits to its use will also be addressed. Finally we will review the potential for clinical use of alternative biomarkers to PSA. Biomarkers both approved and non-approved by the 'Food and Drug Administration' will be included. This literature review has as a main objective to inform health professionals in a systematic way about the current problems surrounding prostate cancer screening and to introduce alternatives to the current screening model, contributing in this way to the study and implementation of changes in the screening, reducing the risks associated with it.

The article selection period began in september of 2017, and ended in february of 2018. The search engine used was PubMed, and the search included original articles, namely multicenter prospective and retrospective studies and comparative studies published in the last 10 years, relating to biomarkers associated with prostate cancer screening. Exclusion criteria involved review articles and original articles with focus on biomarkers used for determination of prognosis, follow-up and treatment monitoring. For information regarding screening models, clinical guidelines were included.

Adjusting screening methodology for prostate cancer, namely on the start and stop age, frequency of screening with prostate specific antigen and its threshold, as well as using alternative biomarkers with greater sensitivity and specificity seem to substantially reduce over diagnosis and overtreatment.

Some of these biomarkers have still not been introduced into clinical practice, which may be associated with both their cost and lack of knowledge on the part of health professionals. Future comparative studies focusing on costs associated with each biomarker are necessary to evaluate their clinical applicability

Palavras-chave: Neoplasia prostática; Detecção precoce de cancro; Biomarcadores; Biomarcadores, Tumor.

Key-words: Prostatic Neoplasms; Early Detection of Cancer; Biomarkers; Biomarkers, Tumor.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS - American Cancer Society
ASCO - American Society for Clinical Oncology
AUA - American Urology Association
AUC - Área sob a curva
CPC - Células prostáticas circulantes
CaP - Cancro da próstata
EAU - European Association of Urology
ERSPC - European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer
ESMO - European Society for Medical Oncology
FDA - Food and Drug Administration
NCCN - National Comprehensive Cancer Network
NND - Número necessário diagnosticar
NNI - Número necessário investigar
PCPT - Prostate Cancer Prevention Trial
PHI - Prostate Health Index
PLCO - Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial
PSA - Antígeno específico da próstata
PSAv - Velocidade PSA
QALY - Anos de vida ajustados por qualidade
SNP - Polimorfismos de nucleotídeo único
TR - Toque retal
USPSTF - United States Preventive Services Task Force
WHO - World Health Organization
fPSA - PSA livre
fcDNA - DNA livre circulante
hK2 - Calicreína humana 2
tPSA - PSA total

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
METODOLOGIA.....	2
ESTRATÉGIAS DE RASTREIO	3
BIOMARCADORES EM CARCINOMA DA PRÓSTATA.....	6
Biomarcadores aprovados pela FDA	6
Biomarcadores não aprovados pela FDA	13
CONCLUSÕES	18
BIBLIOGRAFIA.....	19

INTRODUÇÃO

O cancro da próstata (CaP) é o segundo tipo mais comum de cancro no sexo masculino e a quinta causa mais comum de morte associada ao cancro. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO) a sua incidência em 2012 era de 14.8%. (1) Nos EUA a incidência estimada em 2016 era de 21%, representando um de cada cinco novos diagnósticos de cancro. (2) Apesar do CaP se associar a uma média de anos de vida perdidos de cerca de 2.88 anos, a sua elevada incidência resulta num total de anos de vida perdidos elevado (28 003 anos em 2013). (3) A mortalidade associada depende da idade do doente aquando do diagnóstico, das suas comorbilidades e da agressividade do tumor.(4) Outros fatores de risco incluem a história familiar positiva, raça negra, exposição ambiental ao arsénico inorgânico, hábitos dietéticos inadequados, aumento do perímetro abdominal e hipertensão arterial. (5-7) A colheita de uma história familiar completa auxilia na monitorização do doente, sendo que mesmo a presença de familiar de segundo e terceiro grau com CaP se associam a um aumento significativo do risco. (8) Parece mesmo haver uma correlação positiva com certos painéis genéticos e o desenvolvimento de CaP. (9) No entanto, um PSA (>1.6 ng/mL) medido aos 45-49 anos de idade impõe-se sobre a raça e história familiar positiva no cálculo do risco. (10)

A aplicação clínica do antígeno específico da próstata (PSA) iniciou-se no final de 1980, associando-se a um pico na incidência global do CaP, que se associou em parte à deteção de casos em fase pré-sintomática. (2) Na ausência de um rastreio, a mortalidade específica estimada é de 2.86%. Aplicando um rastreio anual aos 50-74 anos de idade, com um limite do PSA de 4ng/mL para realização de biópsia prostática, esta diminui para 2.15%, uma redução de 24.8% comparativamente à ausência de rastreio. (11) O 'European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer' (ERSPC) concluiu também que apesar de o rastreio ter como benefício a redução da mortalidade específica por CaP, este se associa a um risco significativo de sobrediagnóstico e sobretratamento. (12) Ambos aumentam a morbilidade do doente, dado que são realizados procedimentos desnecessários, em indivíduos cujo CaP nunca viria a desenvolver sintomas clínicos e não estaria associado a morte por CaP. (13) Estão então associados a uma diminuição na qualidade de vida e resultam em mais gastos, particularmente associados ao sobretratamento. (14) Este foi um dos motivos para o ajuste das recomendações da 'United States Preventive Services Task Force' (USPSTF) em 2017, que recomenda um rastreio individualizado dos 55 aos 69 anos de idade, devendo os clínicos informar o doente sobre potenciais benefícios e malefícios associados ao rastreio e tratamento do CaP. (15)

Esta questão essencial do sobrediagnóstico e sobretratamento com a aplicação do PSA no rastreio do CaP criou debate e interesse na investigação de possíveis biomarcadores alternativos que conseguissem colmatar esta falha. Atualmente a 'Food

and Drug Administration' (FDA) aprovou a aplicação clínica do PSA, PSA livre (fPSA), proPSA incluído no 'Prostate Health Index' (PHI) e o PCA3. No entanto existem muitos outros biomarcadores, atualmente em investigação, que mostram resultados promissores.

OBJETIVOS

Dada a discussão que existe em torno do rastreio do CaP, surge a necessidade de rever a informação existente relativa a alternativas bioquímicas potencialmente eficazes no rastreio do CaP. A FDA define biomarcador como qualquer indicador diagnóstico aplicado na avaliação do risco ou presença de doença, incluindo exames imagiológicos. Esta definição é ampla, incluindo também a determinação do risco futuro da doença, rastreio e confirmação da doença, assim como a determinação do prognóstico, estadiamento e monitorização do tratamento. (16) Esta revisão bibliográfica irá apenas abordar procedimentos diagnósticos in-vitro relativos ao rastreio do CaP, com maior enfoque nos biomarcadores aprovados pela FDA. Pretendemos determinar se existem estratégias que mantenham os benefícios de uma deteção precoce e aumento da sobrevida, reduzindo os malefícios associados ao rastreio, de forma a informar profissionais de saúde e doentes sobre as diferentes alternativas atualmente disponíveis e contribuir para o debate do seu interesse e aplicação clínica.

METODOLOGIA

O período de seleção de artigos iniciou-se a setembro de 2017, tendo terminado a fevereiro de 2018. Neste período foi utilizado o motor de busca PubMed, onde foram introduzidas as seguintes palavras-chave na pesquisa: 'Prostate Cancer'; 'Biomarkers'; 'Diagnosis'; 'Early diagnosis'. O limite temporal para a seleção de artigos foi de 10 anos. Foram incluídos na seleção artigos originais nos idiomas inglês e português, excluindo artigos de revisão. Foram também excluídos artigos referentes à aplicabilidade de biomarcadores na determinação do prognóstico do doente, seu seguimento e monitorização da resposta ao tratamento. Foram então selecionados artigos com enfoque em biomarcadores in-vitro associados ao rastreio do CaP. Após uma seleção inicial de artigos relativos tanto a biomarcadores aprovados como não aprovados pela FDA, realizou-se uma nova busca no PubMed centrada em artigos relativos apenas a biomarcadores aprovados pela FDA, de forma a garantir que a seleção prévia tinha abrangido todos os artigos de potencial interesse. Para informação relativa às estratégias de rastreio atualmente publicadas, foram introduzidas as seguintes palavras chave no motor de busca PubMed: 'Prostate Cancer' 'Diagnosis'; 'Guidelines'. Para informação estatística relativa ao CaP, foi realizada uma pesquisa no mesmo motor de busca com as seguintes palavras chave: 'Prostate Cancer'; 'Incidence'; 'Mortality'.

ESTRATÉGIAS DE RASTREIO

Dois estudos randomizados de grandes dimensões com um seguimento de 13 anos estudaram o impacto do rastreio organizado com PSA na saúde pública: O 'European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer' (ERSPC), que incluiu 162 388 homens dos 50 aos 69 anos de idade em 7 países europeus e avaliou as diferenças entre o rastreio organizado e a ausência de rastreio, e o 'Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial' (PLCO) que incluiu 76 685 homens dos 55 aos 74 anos de idade nos EUA e avaliou o rastreio organizado e o oportunístico. (12, 17) O ERSPC concluiu que o rastreio organizado se associava a uma diminuição significativa na mortalidade específica por CaP. Também mostrou que por cada 1000 homens rastreados, 3 evitariam doença metastática. No entanto, esta redução associou-se a sobrediagnóstico e sobretratamento, sendo que para prevenir uma morte por CaP era necessário o rastreio de 781 homens e o tratamento de 27 homens. (12) O estudo de Göteborg, um ramo do ERSCP com um seguimento de 18 anos, mostrou que o rastreio oportunístico com PSA tinha um efeito mínimo na redução da mortalidade específica e se associava a uma maior taxa de sobrediagnóstico, comparativamente ao rastreio organizado (NNI 139 vs 493, NND 23 VS 13). Os tumores detetados no rastreio oportunístico eram contudo mais avançados que no organizado. (18) Por outro lado o PLCO concluiu que não havia diferença estatisticamente significativa na mortalidade entre o rastreio organizado e oportunístico, o que foi associado em parte à melhoria na abordagem terapêutica. Uma limitação deste estudo foi a elevada taxa de contaminação de cerca de 40 a 52% no grupo controlo, o que terá reduzido a deteção de CaP agressivos, tornando mais complexa a avaliação da diferença na mortalidade (17). *Tsodikov et al.* (2017), num estudo comparativo do ERSPC e PLCO concluiu que ambos demonstravam uma associação positiva entre o rastreio e a redução da mortalidade específica. (19)

A USPSTF constatou que o rastreio com PSA se associava a uma pequena redução na mortalidade específica por CaP, estando, no entanto, associado a resultados falsos positivos (FP), sobrediagnóstico e sobretratamento com complicações como incontinência urinária e impotência. Com base nestes achados, a USPSTF recomendou em 2012 contra o rastreio com PSA em todos os homens, independentemente da idade. (20) Após esta recomendação, verificou-se nos EUA uma diminuição de 28.7% no volume da biópsia prostática, sendo menos doentes com um valor de PSA elevado submetidos a este procedimento, e uma redução de 16.2% nas prostatectomias radicais. (21) Em 2017 a USPSTF passou a recomendar o rastreio com base na tomada de uma decisão informada e individualizada nos homens dos 55 aos 69 anos de idade, de forma a compreenderem os riscos e benefícios associados. (15)

Ajustes na idade de início e fim e na frequência do rastreio, assim como nos limites do PSA aplicados para a recomendação de biópsia prostática podem minimizar o

risco de sobrediagnóstico. *Heijnsdijk et al. (2014)*, num estudo de simulação com base no ERSPC, concluiu que o rastreio a cada 3 ou menos anos é mais custo-eficaz que um rastreio com intervalos superiores, sendo considerado ótimo o rastreio bianual dos 55 aos 59 anos. (22) *Lansdorp-Vogelaar et al. (2014)* concluiu que o modelo de rastreio deve ser ajustado com base na dinâmica entre a taxa de sobrediagnóstico e mortalidade específica por CaP, e ser individualizado tendo em conta as comorbilidades do doente. (23) *Vickers et al. (2013)*, no estudo caso-controlo de Malmö, verificou que 44% das mortes associadas a CaP tinham ocorrido em indivíduos com medições de PSA ≥ 1.6 ng/mL entre os 45 e 49 anos. (10) Previamente, *Lilja et al. (2011)* num estudo caso-controlo com 1312 casos e 3728 controlos, havia demonstrado forte correlação entre o valor de PSA antes dos 50 anos de idade e diagnóstico subsequente de CaP, sendo que a associação se mantinha para diagnósticos realizados 25 ou mais anos após a colheita. (24). Assim sendo, um valor inicial de PSA colhido aos 45 anos poderia ser utilizado como forma de avaliação de risco e individualização do rastreio, reduzindo a taxa de sobrediagnóstico, permitindo um rastreio mais apertado nos indivíduos de alto risco.

As *guidelines* da 'National Comprehensive Cancer Network' (NCCN) (2010) recomendam o rastreio oportunístico quinquenal aos 40-49 anos, se PSA < 1 ng/mL, e anual aos 50-74 anos de idade. Como critérios para biópsia inclui um valor de PSA > 2.5 ng/mL ou velocidade do PSA (PSAv) ≥ 0.35 ng/mL/ano. No caso do PSA estar entre 4-10 ng/mL, a NCCN recomenda a aplicação da percentagem de PSA livre (fPSA) em indivíduos em que o risco da biópsia/tratamento é superado pelos comorbilidades, recomendando biópsia se $\leq 10\%$. (25) *Gulati et al. (2013)*, num estudo comparativo, mostrou que a estratégia da NCCN era a que mais vidas salvava quando comparada a estratégias com diferentes idades de início/fim, limite de PSA e intervalo do rastreio. No entanto mostrou também um risco de FP e sobrediagnóstico que quase duplicava quando comparativamente à estratégia de referência (rastreio anual aos 50-74 anos de idade, com um limite de referência para biópsia de 4 ng/mL). Concluiu-se então que uma redução no limiar do PSA ou o acréscimo da PSAv produzia malefícios substanciais quando comparado ao número de vidas salvas. (11)

A 'American Cancer Society' (ACS) (2010) recomenda o rastreio anual aos 50-74 anos de idade com um limite do PSA de 4 ng/mL e bienal se PSA < 2.5 ng/mL. (26) Esta estratégia comparativamente à estratégia de referência leva ao mesmo número de sobrediagnóstico e de vidas salvas. A diferença assenta no menor número de testes realizados aplicando a estratégia da ACS, o que sugere que mantendo a idade de início e o limite de referência do PSA, se pode estender o intervalo entre medições para dois anos se o PSA verificado for baixo. (11)

A 'American Urology Association' (AUA) (2013) recomenda também a tomada de uma decisão informada, recomendando o rastreio bienal em homens dos 55 aos 69 anos de idade. Não recomenda o rastreio em indivíduos com uma esperança de vida inferior a

15 anos. Concluem que parar o rastreio aos 69 anos de idade se associa a menos 5 mortes prevenidas, no entanto leva a uma diminuição no sobrediagnóstico de 38 indivíduos associado a 26 QALY ganhos por cada 1000 homens. (27)

A 'European Society for Medical Oncology' (ESMO) (2013) recomenda que a decisão de realizar uma biópsia prostática deve ter em conta os achados do toque retal (TR), tamanho prostático, etnicidade, raça, idade, comorbilidades, história familiar, valores do paciente e história de biópsias prévias assim como o nível de PSA. No caso de deteção de valor de PSA elevado e biópsia inicial negativa, recomendam a aplicação do teste PCA3, de forma a determinar a indicação para repetir a biópsia. (28) O TR com palpação prostática é parte essencial na avaliação para CaP. *Walsh et al.* (2014), num estudo retrospectivo de 103 homens, concluiu que o TR é capaz de isoladamente identificar pacientes em risco, com uma sensibilidade de 81% e especificidade de 40%, valor preditivo positivo (VPP) de 42% e valor preditivo negativo de 79%. (29)

Tanto a 'European Association of Urology' (EAU) (2016) como a 'American Society for Clinical Oncology' (ASCO) (2012) desaconselham o rastreio em indivíduos com 10-15 ou menos anos de esperança média de vida, dado o benefício reduzido. (30, 31) Apesar destas recomendações verificou-se que uma considerável proporção da população rastreada dos EUA tinha menos de 9 anos de esperança de vida. Um estudo do National Health Interview Survey (NHIS) (2000-2010) mostrou 51% de taxa de rastreio do CaP no grupo com uma esperança média de vida inferior a 9 anos de idade, demonstrando que um uso do PSA discordante das *guidelines* é frequente. (32)

BIOMARCADORES EM CARCINOMA DA PRÓSTATA

Biomarcadores aprovados pela FDA

A FDA aprovou para aplicação clínica os biomarcadores séricos PSA, fPSA, proPSA como parte integrante do PHI e o biomarcador urinário PCA3. Como referido anteriormente, o PCA3 e fPSA já estão integrados em certas estratégias de rastreio, como da ESMO e da NCCN, respetivamente. A norma nº: 060/2011 da Direção Geral de Saúde também já integra a fPSA em casos com PSA 4-10 ng/mL e TR negativo.

PSA

O biomarcador sérico PSA é órgão-específico, no entanto não é específico para o CaP. A proporção de FP aumenta com a idade, pela maior incidência de prostatite e HBP. Segundo *Kilpeläinen* et al. (2010), no estudo prospetivo de 8000 indivíduos do ramo finlandês do ERSPC, os FP atingiam um em cada oito rastreados com um nível de PSA ≥ 4 ng/mL. Destes, mais de metade mantinha valores de PSA elevados, apesar das biópsias subsequentes negativas. Este estudo concluiu que os FP apresentam maior risco de abandono do rastreio, dada a sua experiência desagradável com biópsias desnecessárias e ansiedade associada ao diagnóstico de CaP, ou pela sensação de alívio que se seguia a uma biópsia benigna, entendendo que a sua participação seria desnecessária. (33) Na avaliação de 10000 homens do ramo de Gotenberg do ERSPC, *Bergdahl* et al. (2009) verificou que tanto a mortalidade específica como a global eram significativamente superiores em indivíduos que não participaram no rastreio comparativamente aos participantes (34% vs 13%; 0,8% vs 0.3%), o que mostrou a importância da adesão para a eficácia do rastreio. Tal parece associar-se em parte ao facto de os participantes estarem mais conscientes em relação à sua saúde, mas também pode refletir um grupo com outras comorbilidades que possa não considerar que o ganho de saúde seja significativo. Tendo estes achados em conta, poderíamos considerar o grupo de não participantes como um grupo de alto risco. (34)

Para além do valor de PSA aumentar com a idade, também se associa ao peso e ao consumo de tabaco, com valores inferiores. Num estudo retrospectivo de uma amostra de 31 286 homens do PLCO, *Boniol* et al. (2015) concluiu que com o ajuste do resultado para a idade e valor de PSA inicial se obtinha uma correlação linear positiva com o risco de CaP. No entanto, esta correlação não se verificava para o score de Gleason. (35) A idade parece também ser relevante na individualização do risco do sobrediagnóstico, como demonstrado por *Gulati* et al. (2014). Através de um modelo de microssimulação, com uma amostra de 1000 indivíduos seguida de 1975-2005, concluiu que o risco de sobrediagnóstico pode ser individualizado com base na idade, score de Gleason e valor de PSA, variando de 2.9% a 88.1%. A idade provou ser o preditor individual mais importante de sobrediagnóstico sendo que, por exemplo, para um score de Gleason de 6

ou menos e um nível de PSA de 4.0–4.9ng/mL, o risco de sobrediagnóstico aumenta de 11.6% aos 50-54 anos de idade para 59.9% aos 70-74 anos e 83.4% aos 80-84 anos de idade, o que pode alterar a decisão clínica de instituir tratamento agressivo. (36) Estudando a base de dados SEER (1987-1995), *Vickers et al. (2014)* concluiu que a paragem do rastreio aos 60, 65 e 70 anos de idade se associa a uma redução do excesso de casos diagnosticados em 85%, 68% e 42%, respetivamente. Para homens com mais de 60 anos com um PSA inferior ao limite para biópsia, a probabilidade de apresentarem uma biópsia positiva mostrou-se muito superior à probabilidade de virem a falecer por CaP passados 25 anos. Estes achados justificam um rastreio mais seletivo para homens nesta faixa etária, sendo necessário informar os doentes dos riscos associados à continuação do rastreio. (37)

Stattin et al. (2015), num estudo caso-controlo com 1423 casos e 4269 controlos, mostrou uma associação positiva entre um valor de PSA elevado e a deteção de CaP em estadio avançado, sendo que a maioria dos casos com metástases surgiram em homens com um PSA acima da média medido na década prévia à sua deteção. (38) Um valor de PSA entre 1.5 e 4.0 ng/mL também se parece associar a taxas superiores de CaP, como demonstrado por *Crawford et al. (2011)* num estudo retrospectivo que envolveu 21 502 homens (1997-2008), com taxas de CaP 15 vezes superiores se PSA ≥ 1.5 ng/mL comparativamente ao PSA < 1.5 ng/mL. Este intervalo parece representar uma zona de alerta precoce para a deteção de CaP. Neste estudo, o valor que apresentava maior sensibilidade/especificidade era o de 1.7 ng/mL. (39)

Van Leeuwen et al. (2010), num estudo retrospectivo com base nos dados do 'Northern Ireland Cancer Registry' (1994-2006), verificou que a maioria da redução da mortalidade específica se realizava em homens com um valor de PSA inicial moderado/elevado (PSA de 4.0 ng/mL a 19.9 ng/mL). A redução absoluta de mortalidade específica foi de 0.05 por 10000 pessoas-ano com um PSA inicial de 0-1.9 ng/mL e 8.88 por 10000 pessoas-ano com PSA inicial de 10-19.9 ng/mL, aumentando com o aumento do PSA inicial. O NNI e NNT diminuíram com o aumento do PSA inicial, o NNI variou de 24642 a 133 homens para um PSA inicial de 0.0-1.9 ng/mL ou PSA de 10.0-19.9 ng/mL, respetivamente. Assim, concluíram que a aplicação de um rastreio mais intensivo, com diminuição do limiar do PSA, aumentava o NNI e NNT mas sem ter um efeito significativo na redução da mortalidade por CaP. (40) Um estudo semelhante de *Potts et al. (2010)*, avaliando registos de 5570 doentes submetidos a biópsia prostática na Cleveland Clinic (1990-2006), constatou que ao longo do tempo não se verificou uma correlação positiva entre o aumento dos níveis de PSA e resultados positivos na biópsia. Após 2000, a área sob a curva (AUC) manteve-se próxima de 0.5, sugerindo uma falta de valor preditivo positivo. Assim sendo, o teste PSA teria uma eficácia semelhante ao atirar de uma moeda ao ar na predição de deteção de CaP na biópsia. (41)

Carter et al. (2007) propôs uma nova forma de avaliação do risco para o CaP, através da contagem de risco da PSAv, que consiste na contagem do número de vezes que esta subiu acima de um valor de referência. Avaliando os resultados de 717 homens do 'Baltimore Longitudinal Study of Aging' com medições de PSAv nos 10 a 20 anos prévios, concluiu que a probabilidade de CaP aumentava diretamente com o número de contagens acima do valor de referência. (42) Um estudo retrospectivo de 1049 homens (1989-2001) comparou o score de Gleason com a PSAv do doente, descrevendo-a como um marcador útil da agressividade do tumor. *Loeb et al. (2008)* concluiu que uma PSAv superior a 2ng/mL/ano estava significativamente associada a um score de Gleason ≥ 7 (sensibilidade de 32%, especificidade de 75%, valor preditivo positivo de 29% e valor preditivo negativo de 77%), sendo que em doentes com CaP confinado ao órgão, a PSAv era significativamente menor (PSAv média de 0.81 ng/mL/ano). (43) Por outro lado, *Wolters et al. (2008)* num estudo semelhante com 2217 participantes do ramo de Roterdão da ERSP, verificou que a PSAv era um preditor significativo de CaP na análise univariável. No entanto, numa análise multivariável (PSA, volume prostático, TR, biópsia prévia negativa), esta perdia a sua significância, não representando um preditor significativo e independente para o CaP. (44) Contudo, em contraste com *Loeb et al.*, que usou valores de PSA separados por 6 meses no mínimo e 24 meses no máximo, este estudo calculou a PSAv com PSA separados por 4 anos. Esta diferença no método de cálculo pode explicar os diferentes resultados. *Loeb et al. (2012)* analisou a contagem de risco da PSAv num contexto de rastreio populacional, que incluía 18214 homens (1989-2001), usando um limite de PSAv de 0.4 ng/mL/ano. Após o ajuste para a idade e PSA, a contagem de risco da PSAv de 2 foi associada a um aumento de 8.2 vezes do risco de CaP e a um risco de 5.4 vezes para CaP com Gleason 8 a 10, comparativamente a uma contagem ≤ 1 . Uma contagem de risco da PSAv de 2 apresentava uma sensibilidade de 40%, especificidade de 96%, VPP de 40% e VPN de 96%. A análise ROC revelou um aumento significativo na deteção de CaP aplicando a contagem de risco da PSAv, comparativamente ao uso do PSA e idade (AUC de 0.89 com idade e PSA; AUC de 0.90 com contagem de risco vPSA). O uso deste método tem o potencial para reduzir biópsias desnecessárias e o diagnóstico de carcinomas de baixo risco indolentes, reduzindo o potencial sobretratamento nestes carcinomas. (45)

fPSA

A %fPSA foi aprovada em 2009 para o rastreio do CaP pela FDA em homens com 50 ou mais anos de idade que se apresentem sem alterações suspeitas no TR e com níveis de PSA entre 4 e 10 ng/mL. Este teste pode ser usado como um auxiliar na discriminação entre CaP e doença benigna, sendo que continua a ser necessária biópsia prostática para o diagnóstico. *Huang et al. (2014)*, num estudo retrospectivo de 558 homens chineses (1999-2012), verificou que as taxas de deteção de CaP aumentavam

inversamente com a %fPSA. No entanto, não se encontrou uma relação estatisticamente superior na detecção em relação ao uso do PSA isoladamente (AUC menor na %fPSA). (46) Por outro lado, *Liang et al.* (2011) estudou 250 casos com CaP da coorte SABOR e 250 controles e concluiu que a %fPSA tinha valor diagnóstico independente para CaP, com uma sensibilidade e especificidade de 70% e 80% respetivamente. (47) *Kitagawa et al.* (2014) também demonstrou que a %fPSA era um forte preditor para detecção de CaP e de prognóstico no estudo de 1277 homens com PSA entre 2.1-10 ng/mL (2000-2011). Este estudo analisou os fatores idade, tPSA e %fPSA no tempo para detecção de CaP e concluiu que todos os fatores eram preditores significativos de CaP na biópsia, sendo que estava inversamente relacionado com a %fPSA. Numa análise multivariável, a idade e %fPSA foram os preditores mais fortes na detecção de CaP. (48) *Pepe et al.* (2010) aplicou um protocolo de rastreio em 14 453 indivíduos, tendo indicação para biópsia: TR suspeito; tPSA > 10ng/mL; tPSA ≤2.5 ng/mL com %f-PSA<15%; tPSA 2.6 - 4 ng/mL com %f-PSA <20%; tPSA 4.1 - 10 ng/mL com %f-PSA<25%. Verificou uma maior detecção de CaP nos grupos de PSA menor (29,1, 37.4 e 28.8%) e concluiu que este protocolo permitia reduzir o número de biópsias iniciais e de repetição, comparativamente ao uso de apenas o tPSA > 4 ng/mL. (49) *Faria et al.* (2012), num estudo prospetivo de 17571 homens (2004-2007), concluiu que a inclusão da %fPSA ≤ 15 em homens com tPSA 2.5-3.9 ng/mL e TR normal como critério para biópsia, aumentava a taxa de detecção de CaP em 19.3% (de 3.1% a 3.7%), aumentando a recomendação de biópsia em 17%. Apesar do VPP ser menor em comparação ao critério PSA≥4.0 ng/mL (31.1% vs. 37.6%), o estudo concluiu que uma menor %fPSA estava associada a um aumento do VPP (%fPSA ≤10, VPP de 36.5%). Neste estudo o critério com maior VPP foi a associação de PSA ≥4.0 ng/mL com toque retal alterado (70.9%). (50)

proPSA

A [-2]proPSA é uma isoforma molecular do fPSA que foi aprovada pela FDA para uso em homens com 50 ou mais anos de idade com um tPSA de 4-10 ng/mL e toque retal não suspeito, de forma a permitir o cálculo do PHI. O PHI refere-se ao cálculo $[(\text{proPSA}/\text{fPSA}) \times (\sqrt{\text{tPSA}})]$. Um estudo multicêntrico caso-controlo não-randomizado por *Stephan et al.* (2013), envolvendo 1362 homens (2003-2012) recrutados retrospectivamente e prospetivamente, verificou que tanto o PHI e %proPSA superaram significativamente os outros parâmetros laboratoriais (p2PSA, %fPSA, tPSA, fPSA) e clínicos (idade, volume prostático, resultado TR), comparando a AUC. PHI e proPSA apresentavam uma AUC de 0.74 e 0.725, respetivamente. Verificou também que o PHI apresentava a melhor capacidade de diferenciação entre CaP agressivo e não-agressivo, apresentando uma relação positiva com o score de Gleason. (51) *Loeb et al.* (2015), num estudo semelhante multicêntrico prospetivo envolvendo 658 homens com PSA de 4-10ng/mL (2004-2009), verificou que o PHI era significativamente superior em homens com Gleason de 7 ou

superior, superando os restantes parâmetros (tPSA, FPSA, proPSA) na detecção de CaP clinicamente significativo. O uso de um limiar de 28.6 permitiu evitar cerca de 30% das biópsias desnecessárias (negativas, CaP clinicamente insignificante), enquanto se falhava ou atrasava o diagnóstico de 10% dos casos. (52)

A densidade do PHI (dPHI) consiste no ajuste do cálculo do PHI ao volume prostático determinado ecograficamente. *Tosoian et al.* (2017) determinou a dPHI em 188 homens ao longo de um ano, com $\text{PSA} \geq 2 \text{ ng/mL}$, e verificou que, usando um limiar de 0.43 a dPHI apresentava uma sensibilidade de 96.4% e uma especificidade de 38.0%, com um VPP, abaixo deste limiar, de 96.4%. A dPHI apresentava capacidade para diferenciar entre CaP clinicamente significativo (AUC 0.84), evitando 38% das biópsias desnecessárias (benignas; CaP clinicamente insignificante), falhando na detecção de 2% dos carcinomas significativos e não falhando nenhum CaP com score de Gleason ≥ 7 . (53)

Heidegger et al. (2015), no estudo retrospectivo de 381 homens submetidos a biópsia (1993-2006), concluiu que a PSAv, %fPSAv, %proPSAv, proPSA/PSA/V conseguiram diferenciar eficazmente doentes com CaP de homens com achados benignos. Em pacientes com CaP, o PSAv aumentava nos 7 anos prévios ao diagnóstico, com um aumento mais significativo no ano anterior, enquanto que, em homens com biópsia benigna, este não mostrava alterações. A %fPSAv apresentava uma tendência negativa no CaP, sendo a diferença mais significativa entre os pacientes com CaP e próstata benigna nos 2 anos prévios ao diagnóstico, com uma especificidade de 45.3% e sensibilidade de 90%. A %proPSAv e a relação proPSA/PSA/V atingiam uma especificidade e sensibilidade máximas dois anos previamente ao diagnóstico (26.6%; 90%). O maior poder de discriminação verificou-se nos dois anos prévios ao diagnóstico em todos os parâmetros. De todos os avaliados a %fPSAv mostrou a melhor especificidade (45.3%) e sensibilidade de 90%. (54)

PCA3

O teste PCA3 mede a concentração de moléculas RNA do gene 3 do CaP (PCA3) e do PSA e calcula o ratio entre ambos (score PCA3) numa colheita urinária pós-TR. Foi aprovado para uso clínico pela FDA em 2012, como meio auxiliar na decisão de repetir biópsia prostática em homens com ≥ 50 anos de idade com biópsias prévias negativas. Um score PCA3 < 25 associa-se a menor probabilidade de biópsia positiva; no entanto, a biópsia prostática é necessária para estabelecer o diagnóstico de CaP. Estudos prospetivos multicêntricos realizados na Europa e EUA demonstraram que a probabilidade de detecção de CaP numa biópsia de repetição aumenta com o score de PCA3. *Haese et al.* (2008), com 470 participantes, e *Marks et al.* (2007) com 233, concluíram que este teste constituía um preditor independente estatisticamente significativo de CaP numa biópsia de repetição positiva e que um limiar de aproximadamente 35 permitia o balanço ideal entre a sensibilidade e especificidade, com

uma especificidade de 72% e uma sensibilidade de 47%/58%. *Crawford et al. (2012)*, num estudo prospetivo com 1962 participantes, também chegou à conclusão que um limiar de 35 se associava a uma redução de 13% nos FP, reduzindo em 77.1% o número de biópsias desnecessárias comparativamente ao PSA. No entanto, este mesmo limiar associou-se a um aumento de 21.6% no número de doentes com resultados falsos negativos (PCA3 baixo, sem biópsia subsequente apesar da presença de CaP). Como alternativa, foi proposto um limiar de 10, que se associa a uma sensibilidade de 86.5%, especificidade de 36.6%, VPP de 49.6% e VPN de 79%. Neste caso, 36.8% dos indivíduos teriam testes falso-positivo, mas seriam evitados 20% das biópsias negativas. Simultaneamente apenas 5% da população em estudo teria resultados falso-negativo. Esta proposta poderia potencialmente reduzir o número de biópsias desnecessárias, reduzir gastos associados e minimizar o número de CaP não detetados. *Marks et al. (2007)* mostrou uma AUC de 0.68 do PCA3, superior à AUC do PSA de 0.52, para homens com um PSA ≥ 2.5 ng/mL, e *Crawford et al. (2012)* reportou que a AUC do PCA3 associado ao PSA era superior (0.720) mas não significativamente diferente da AUC do PCA3 isolado (0.706). *Hasse et al. (2008)* concluiu também que o PCA3 apresentava melhor potencial diagnóstico que a %fPSA, com uma AUC de 0.66, comparativamente a 0.58. Para além disto, o PCA3 mostrou ter uma performance semelhante tanto em pacientes idosos (≥ 65 anos) como mais jovens (< 65 anos), sendo independente do volume prostático e do PSA_t. É possível que o PCA3 seja capaz de indicar o estadió clínico e agressividade do tumor, dado que estes três estudos encontraram uma correlação significativa com o estadió clínico, score de Gleason e percentagem de envolvimento tumoral nas biópsias prostáticas. *Crawford et al. (2012)* encontrou também uma diferença significativa entre achados suspeitos (ASAP e/ou HGPIN) e benignos na biópsia, ao contrário do PSA, que se mostrou insensível a achados suspeitos na biópsia. (55-57) *Deras et al. (2008)*, num estudo semelhante com 570 participantes, chegou a conclusões idênticas, com uma especificidade de 74% e sensibilidade de 54%, referindo também que a precisão diagnóstica do teste não era afetada pelo facto de estarmos perante uma primeira biópsia ou de repetição e que o PCA3 era capaz de diferenciar entre achados benignos e CaP. (58)

Chun et al. (2009), num estudo retrospectivo de 809 homens, concluiu que o PCA3 representava um marcador diagnóstico independente de CaP, mas que, quando associado a um modelo multivariável, incluindo a idade, TR, tPSA, volume prostático e história prévia de biópsia, se associava a um ganho estatístico de 2.3 a 4.6% na capacidade diagnóstica. (59)

O PCA3 tem o potencial uso de adjuvante do PSA no rastreio, aumentando significativamente a probabilidade pré-biópsia de deteção de CaP. *Wei et al. (2014)*, num estudo multicêntrico com 859 homens, verificou este efeito tanto nas biópsias iniciais como em biópsias de repetição, sendo que foi demonstrado como em estudos anteriores

que este teste auxilia na detecção de carcinomas invasivos. Com um PCA3 de 20 ou inferior, a taxa de subdiagnóstico de carcinomas de alto grau era baixa nas biópsias de repetição, mas elevada na inicial. Este achado sugeria que um valor inferior de PCA3 seria necessário para excluir a necessidade de biópsia numa fase inicial. (60) *Birnbaum* et al. (2015), aplicando um modelo de simulação sobre o estudo referido anteriormente, concluiu que o uso conjunto de ambos os biomarcadores reduz os efeitos adversos do rastreio, com uma redução dos falsos positivos e sobrediagnóstico em 25%, sem alteração no número de vidas salvas (PCA3 > 35 e PSA entre 4 e 10 ng/mL). (61)

Biomarcadores não aprovados pela FDA

TMPRSS2: ERG + PCA3

O gene de fusão TMPRSS2 com ERG (TMPRSS2:ERG) tem sido alvo de extensa investigação recentemente. *Perner* et al. (2007) e *Mosquera* et al. (2009), aplicando uma análise FISH em amostras de tecido prostático colhidas em meio-hospitalar de 300 e 140 indivíduos respetivamente, verificaram uma correlação entre TMPRSS2:ERG e alterações sugestivas de malignidade, estando presente em cerca de 50% dos casos com diagnóstico de CaP, mesmo em estadios iniciais. Das amostras selecionadas com patologia benigna, nenhuma apresentava esta alteração. (62, 63) *Tomlins* et al. (2011) estudou o potencial da aplicabilidade do teste urinário (mRNA TMPRSS2:ERG) ,com colheita após o TR, como forma não-invasiva de rastreio e estratificação do risco. Num estudo prospetivo com 218 homens que aguardavam realização de prostatectomia radical, e 623 homens (coorte académica) e 471 homens (coorte comunidade) que aguardavam a realização de biópsia prostática, verificou que o teste urinário se associava ao volume do tumor, score de Gleason e CaP clinicamente significativo. No entanto, não encontrou uma associação entre este e marcadores clínicos e patológicos pré-biópsia (PSA, volume prostático na ecografia, dPSA). Na coorte académica, o TMPRSS2:ERG apresentava um AUC de 0.71, significativamente superior ao PSA de 0.61, situação que não se verificou na coorte comunitária. A combinação com o PCA3 levou a um aumento da AUC em ambos os grupos que aguardavam biópsia, mostrando-se significativamente superior ao uso do PSA isoladamente. A combinação TMPRSS2:ERG com PCA3 mostrou-se também útil na estratificação do risco de CaP e sua agressividade.(64) *Sanda* et al. (2017), num estudo prospetivo de 1077 homens, também verificou que o teste urinário TMPRSS2:ERG combinado com PCA3 aumentava a especificidade do rastreio do CaP relativamente ao uso do PSA isoladamente de 18 para 39% (mantendo a sensibilidade de 95%), com deteção precoce e associação com a agressividade do tumor, evitando cerca de 42% de biópsias desnecessárias. (65)

Biomarcadores urinários

Outros biomarcadores urinários para a deteção de CaP parecem ser úteis na identificação de indivíduos com risco de carcinoma mais agressivo. *Leyten* et al. (2015), num estudo retrospectivo com 358 amostras, determinou que um painel de 3 biomarcadores urinários (HOXC6, TDRD1, DLX1) apresentava uma AUC de 0.77, superior ao PCA3 (0.68) na deteção de CaP com score Gleason ≥ 7 . A sua combinação com o PSA (AUC de 0.72) aumentava a precisão diagnóstica do rastreio (AUC de 0.81). (66) Outros potenciais biomarcadores diagnósticos de CaP em investigação incluem a zinco-alfa 2-glicoproteína urinária e o ratio da expressão dos ácidos nucleicos urinários TSPAN13/S100A9. (67, 68)

Células prostáticas circulantes

Murray et al. (2016), num ensaio clínico randomizado de homens com rastreio positivo (PSA >4.0 ng/mL ou TR alterado), avaliou a utilidade das células prostáticas circulantes (CPC) na seleção de indivíduos para biópsia prostática. Um grupo de 649 homens realizou biópsia independentemente dos valores de CPC, e outro grupo de 552 só realizou biópsia com CPC positivo. Neste segundo grupo reduziu-se o número de biópsias desnecessárias em 42%. (69) *Murray et al.* (2014), num estudo prospetivo com 1123 homens com PSA entre 4 e 10 ng/mL que aguardavam biópsia inicial, verificou que 12.8% da população com diagnóstico subsequente de CaP não apresentava CPCs, apresentando este subgrupo um score de Gleason e PSA sérico menor, assim como uma idade mais avançada. Este subgrupo cumpriria critérios para vigilância ativa, o que diminuiria o número de biópsias desnecessárias. Neste estudo, os CPCs falharam na deteção de 8% dos doentes com biópsia positiva. (70) Para além disto, o uso da deteção da enzima P504S nas CPC é útil para diferenciar patologia benigna de maligna, como mostrado também por *Murray et al.* (2013). Num estudo prospetivo de 359 homens com rastreio positivo (PSA >4 ng/mL; vPSA > 0.75 ng/ml/ano; TR anormal), verificou-se que 5.9% apresentavam CPC negativos para P504S, apresentando este uma sensibilidade de 9.29% e especificidade para doença benigna de 100%. Nenhum homem com CaP apresentava CPC sem esta enzima. (71)

Painel de microRNA

Sharova et al. (2016), num estudo caso-controlo (36 casos e 31 controlos) encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre biópsias com diagnóstico de CaP e benignas com a aplicação de um painel de microRNAs (miR-106a, miR-20a, miR-223 e miR-21). Este painel apresentava uma AUC conjunta de 0.84, superior à AUC do PSA. (72) Um estudo semelhante (28 casos e 12 controlos) analisou a aplicabilidade clínica de 10 microRNAs. *Daniel et al.* (2017) concluiu que sete destes microRNAs apresentavam diferença estatisticamente significativa, com uma AUC variável de 0.7538 (miR-127-3p) a 0.9462 (miR-329-3p), também superior ao PSA. (73) Outros estudos com avaliação de diferentes microRNAs também concluíram que estes atuam como biomarcadores específicos no diagnóstico do CaP. (74, 75)

DNA livre circulante

Schütz et al. (2015) num estudo caso-controlo (204 casos e 207 controlos) analisou a concentração de DNA circulante livre (fcDNA) e PSA sérico. Não encontrou nenhuma correlação entre ambos os biomarcadores, sendo que os 5 homens com CaP e PSA ≤4 ng/mL apresentavam instabilidade cromossómica. A AUC obtida para este foi de 0.92, com uma especificidade de 95% e sensibilidade de 73%. O fcDNA

associou-se positivamente a score de Gleason >7 e a idade não aparentava ter influência sobre os seus valores. Este teste mostrou-se eficaz na distinção entre CaP e patologia benigna prostática, constituindo um potencial biomarcador diagnóstico futuro. (76) Outros estudos também reportaram sensibilidades e especificidades próximas às referidas, reforçando o potencial de aplicabilidade futura deste biomarcador no aumento da especificidade do rastreio. (77, 78)

Regiões de metilação do DNA

A metilação de DNA no cromossoma 8q24 parece estar associada a um aumento na suscetibilidade ao CaP. *Barry et al.* (2017), num estudo caso-controlo (694 casos e 703 controlos do PLCO), estudou 50 locais CpG em amostras pré-diagnósticas e encontrou uma associação positiva com a deteção de CaP em 8 locais. Estes não apresentavam uma associação estatisticamente significativa com a idade de apresentação. Apenas 1 destes mostrou associação positiva com a agressividade do tumor (região MYC). (79) A metilação em regiões promotoras genéticas, como GSTP1, APC, RAR β 2 e PITX2, representa uma alteração precoce associada ao CaP. *Steiner et al.* (2010), num estudo caso-controlo (25 casos e 6 controlos) com amostras de tecido prostático, verificou uma forte correlação positiva do RAR β 2 com o risco de CaP, sendo que regiões histologicamente normais, adjacentes ao tumor, apresentavam taxas elevadas de metilação. Este achado sugere o potencial uso destas regiões de metilação em indivíduos com risco de CaP, mas que apresentam biópsias benignas. O GSTP1 também parece promissor, apresentando a maior sensibilidade discriminativa e associando-se, como o RARB2, ao score de Gleason. (80)

Pipinikas et al. (2008), analisou amostras sanguíneas de 125 homens e verificou que a expressão de HIF1- α estava significativamente aumentada no subgrupo de CaP sem metástases comparativamente ao grupo sem doença. Na presença de doença metastática, a expressão diminuía cerca de catorze vezes. Estes achados sugerem que a expressão de HIF1- α seja útil no diagnóstico de CaP em estadios iniciais. (81) *Basu et al.* (2015) também notou um aumento da sua expressão no tecido tumoral e concluiu que o aumento da expressão de HIF1- α é possivelmente responsável pela indução da metilação de regiões promotoras. (82)

Polimorfismos de nucleotídeo único

Klein et al. (2012), num estudo caso-controlo (943 casos e 2829 controlos), estudou a aplicabilidade de múltiplos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no rastreio do CaP. Encontrou uma associação positiva em alguns SPNs com o score de Gleason e o estadio clínico \geq T3. No entanto, verificou que este apresentava uma AUC inferior ao PSA (0.57 e 0.79), sem benefício no seu uso conjunto, que apresentava menor capacidade discriminativa (redução AUC de 0.800 para 0.788 na deteção de estadio

clínico avançado). (83) No entanto, tanto *Liss et al. (2015)* como *Acebo et al. (2017)*, em estudos semelhantes (1227 casos e 1017 controlos; 818 casos e 1 006 controlos), verificaram que os SNPs constituem um fator de risco independente de CaP, com benefício no seu uso com o PSA. *Acebo et al. (2017)* concluiu que a combinação de múltiplos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na determinação de um score de risco genético se associava fortemente ao CaP, com uma AUC de 0.66. Combinando este score com a história familiar e factores de risco ambientais (diabetes; hábitos alcoólicos; consumo de carnes vermelhas; IMC) a AUC aumentava para 0.71, podendo SNPs ter aplicabilidade num modelo preditivo de estratificação de risco individual de CaP. (9, 84) O uso de SNPs para seleccionar homens com maior risco genético no rastreio tem também o potencial para diminuir o sobrediagnóstico. *Pashayan et al. (2015)*, num estudo caso-controlo (17 012 casos e 9 404 controlos), mostrou que o número de casos sobrediagnosticados na população rastreada diminuía com a aplicação de um score de risco poligenético. (85)

Genes regulados por androgénios

A expressão de genes regulados por androgénios em tecidos sensíveis a androgénios, como a próstata, parece ter um papel protetor no CaP. *Altintas et al. (2013)* analisou 50 amostras de biópsias prostáticas em pacientes com CaP, comparando os resultados com amostras de tecido histologicamente normal. A expressão de PCA3 e DLX1 apresentavam resultados semelhantes na sua associação ao CaP, com AUC de 0.91 e 0.96 respetivamente. CRYAB, KCNMA1 E SDPR associaram-se positivamente a achados benignos, podendo ser considerados como genes protetores. A combinação dos dois genes associados ao CaP e os três protetores resultou numa AUC de 0.998. Assim sendo, estes achados poderiam ser utilizados como forma de estratificação do risco de CaP. (86)

Painel de calicreínas

Lilja et al. (2011) encontrou uma associação significativa entre o fPSA, a relação entre o fPSA e o tPSA e a calicreína humana-2 (hK2) e o desenvolvimento de CaP. A determinação da hK2, em conjunto com a fPSA e tPSA, parece então aumentar a especificidade do rastreio, com benefícios mais significativos quando aplicada em homens com PSA_t superior à mediana (≥ 0.63 ng/ml) ou no quartil superior (≥ 0.95 ng/ml). (24). *Bryant et al. (2015)*, num estudo prospetivo com 6129 participantes, verificou que um painel de calicreínas (PSA; tPSA; fPSA; PSA intacto; hK2) apresentava uma sensibilidade superior ao uso do PSA isoladamente no rastreio do CaP (AUC de 0.719 vs. 0.634), reduzindo o número de biópsias desnecessárias em 428 homens. No entanto, dos 133 diagnósticos em estadios avançados, este método atrasava o diagnóstico em 14. *Parekh et al. (2015)*, num estudo semelhante, verificou também que este painel de

calicreínas se associava ao aumento na sensibilidade de detecção de CaP clinicamente significativa (Gleason ≥ 7). (87, 88)

Outros biomarcadores que se encontram atualmente em investigação com potencial utilidade diagnóstica incluem: Anexina A3 urinária, que apresenta uma relação inversa com o CaP e parece aumentar a especificidade da detecção em homens com tPSA de 2 a 10 ng/mL e TR normal, evitando biópsias desnecessárias; (89) Angiogenina sérica, que está aumentada nos pacientes com CaP e parece auxiliar na detecção de CaP quando tPSA < 4 ng/mL; (90) Galectina-3 sérica, que parece ser útil como marcador complementar ao PSA; (91) Survivina plasmática, cuja expressão parece associar-se positivamente ao CaP; (92) Esfingosina-1-fosfato sérica, cujos níveis são significativamente superiores em indivíduos saudáveis ou com hiperplasia benigna da próstata, comparativamente a indivíduos com CaP; (93) Prostassomas séricos, que parecem apresentar elevada sensibilidade e especificidade e que são capazes de determinar a severidade da doença, diferenciando entre CaP de baixo, médio e elevado score de Gleason. (94)

A sarcosina chegou a ser considerada um dos biomarcadores mais promissores para o rastreio do CaP; no entanto estudos recentes mostraram que tanto a sarcosina sérica como a urinária não apresentam utilidade para o diagnóstico de CaP. *Ankerst et al.* (2015), num estudo caso-controlo (251 casos da coorte SABOR e 246 controlos) concluiu que os valores de sarcosina sérica se sobrepunham nos casos e controlos. (95) *Gkotsos et al.* (2017), num estudo semelhante, verificou que a sarcosina urinária e o uracil também não apresentavam valor diagnóstico. No entanto este estudo mostrou que o ácido quinurénico urinário colhido após TR melhorava a capacidade diagnóstica, correlacionando-se inversamente com o CaP. (96) Outros biomarcadores que também não mostraram utilidade incluem a fascina-1 tecidual, adiponectina sérica e DNA livre urinário. (97-100)

CONCLUSÕES

O sobrediagnóstico e sobretratamento associados ao rastreio do cancro da próstata com o teste do PSA são significativos, o que pode estar associado tanto à sua baixa especificidade como ao uso excessivo, dado que muitos médicos o encaram como um teste simples e seguro e não reconhecem os seus potenciais malefícios e ineficácia a longo prazo.

Com o estudo e comparação de diferentes estratégias de rastreio para o CaP, concluiu-se que tanto o ajuste do uso do PSA na idade de início e fim do rastreio, com um rastreio mais seletivo após os 60 anos de idade, como na frequência deste e no limiar de PSA aplicado para biópsia prostática, podem reduzir o número de biópsias desnecessárias, bem como os custos e morbilidade associadas ao sobre diagnóstico e sobre tratamento. A aplicação da zona de alerta precoce para o CaP do PSA (1.5-4.0 ng/mL) e ter em conta o risco da vPSA, apresentam utilidade para o rastreio, reduzindo o NND e NNT. Apesar destes ajustes obterem efeitos benéficos, algumas *guidelines* publicadas até à data já recomendam o uso de biomarcadores alternativos ao PSA como adjuvantes, nomeadamente o PCA3 e fPSA nas *guidelines* da ESMO e NCCN, assim como nas recomendações da DGS.

A aplicação de biomarcadores mais sensíveis e específicos, com capacidade para distinguir entre um tumor indolente e agressivo, resultaria numa redução do sobrediagnóstico e sobretratamento associados ao rastreio com o biomarcador PSA. Existem atualmente múltiplos biomarcadores alternativos em estudo, sendo que a FDA aprovou para utilização clínica os biomarcadores PSA, fPSA, proPSA como parte integrante do PHI e o biomarcador urinário PCA3. Tanto estes, como alguns dos biomarcadores ainda não aprovados pela FDA, mostram potencial de aplicabilidade no rastreio, no entanto alguns ainda não foram introduzidos na prática clínica. Esta questão pode derivar tanto dos custos associados, como do desconhecimento por parte dos profissionais de saúde da sua existência. Nesta revisão bibliográfica não foram abordados os custos associados à aplicação clínica dos biomarcadores, o que constitui um fator essencial na sua escolha futura, embora os novos biomarcadores possam reduzir os custos do rastreio pela redução do sobre diagnóstico, no entanto devemos comparar esta redução com os custos associados ao teste em si. Assim sendo, novos estudos sobre esta temática são necessários para avaliar a viabilidade da aplicação clínica de diferentes biomarcadores.

Objetivos da aplicação futura de outros biomarcadores para além do PSA no rastreio do cancro da próstata incluem uma estratificação eficaz do risco, predizendo a progressão do cancro com consequente redução no sobrediagnóstico e sobretratamento. A sua utilidade também se aplicará no seguimento e monitorização do tratamento do

cancro da próstata, situação que não foi alvo de discussão nesta revisão, mas que deverá ser igualmente tida em consideração no potencial clínico destes biomarcadores.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2015;136(5):E359-E86.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2016*. CA: a cancer journal for clinicians. 2016;66(1):7-30.
3. Syriopoulou E, Bower H, Andersson TML, Lambert PC, Rutherford MJ. Estimating the impact of a cancer diagnosis on life expectancy by socio-economic group for a range of cancer types in England. *Br J Cancer*. 2017.
4. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The Worldwide Epidemiology of Prostate Cancer: Perspectives from Autopsy Studies. *The Canadian journal of urology*. 2008;15(1):3866-71.
5. Esposito K, Chiodini P, Capuano A, Bellastella G, Maiorino MI, Parretta E, et al. Effect of metabolic syndrome and its components on prostate cancer risk: meta-analysis. *Journal of endocrinological investigation*. 2013;36(2):132-9.
6. Castello A, Boldo E, Amiano P, Castano-Vinyals G, Aragonés N, Gómez-Acebo I, et al. Mediterranean dietary pattern is associated to low risk of aggressive prostate cancer: MCC-Spain study. *The Journal of urology*. 2017.
7. Roh T, Lynch CF, Weyer P, Wang K, Kelly KM, Ludewig G. Low-level arsenic exposure from drinking water is associated with prostate cancer in Iowa. *Environmental research*. 2017;159:338-43.
8. Albright F, Stephenson RA, Agarwal N, Teerlink CC, Lowrance WT, Farnham JM, et al. Prostate cancer risk prediction based on complete prostate cancer family history. *The Prostate*. 2015;75(4):390-8.
9. Gómez-Acebo I, Dierssen-Sotos T, Fernández-Navarro P, Palazuelos C, Moreno V, Aragonés N, et al. Risk Model for Prostate Cancer Using Environmental and Genetic Factors in the Spanish Multi-Case-Control (MCC) Study. *Scientific reports*. 2017;7(1):8994.
10. Vickers AJ, Ulmert D, Sjöberg DD, Bennette CJ, Björk T, Gerdtsson A, et al. Strategy for detection of prostate cancer based on relation between prostate specific antigen at age 40-55 and long term risk of metastasis: case-control study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2013;346:f2023.
11. Gulati R, Gore JL, Etzioni R. Comparative effectiveness of alternative PSA-based prostate cancer screening strategies. *Annals of internal medicine*. 2013;158(3):145-53.
12. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V, et al. The European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer – Prostate Cancer Mortality at 13 Years of Follow-up. *Lancet*. 2014;384(9959):2027-35.
13. Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Wever E, Gulati R, et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(6):374-83.
14. Heijnsdijk EA, de Koning HJ, Klinker H, de Koning HJ, Wever EM, Draisma G, Roobol MJ, de Koning HJ. Overdetection, overtreatment and costs in prostate-specific antigen screening for prostate cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(11):1833-8.
15. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ. The US Preventive Services Task Force 2017 Draft Recommendation Statement on Screening for Prostate Cancer: An Invitation to Review and Comment. *Jama*. 2017;317(19):1949-50.
16. Gutman S, Kessler LG. The US Food and Drug Administration perspective on cancer biomarker development. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(7):565-71.
17. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(2):125-32.
18. Arnsrud Godtman R, Holmberg E, Lilja H, Stranne J, Hugosson J. Opportunistic Testing Versus Organized Prostate-specific Antigen Screening: Outcome After 18 Years in the Göteborg Randomized Population-based Prostate Cancer Screening Trial. *European Urology*. 2010;68(3):354-60.

19. Tsodikov A, Gulati R, Heijnsdijk EAM, Pinsky PF, Moss SM, Qiu S, et al. Reconciling the Effects of Screening on Prostate Cancer Mortality in the ERSPC and PLCO Trials. *Annals of internal medicine*. 2017;167(7):449-55.
20. Moyer VA. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of internal medicine*. 2012;157(2):120-34.
21. Halpern JA, Shoag JE, Artis AS, Ballman KV, Sedrakyan A, Hershman DL, et al. National Trends in Prostate Biopsy and Radical Prostatectomy Volumes Following the US Preventive Services Task Force Guidelines Against Prostate-Specific Antigen Screening. *JAMA surgery*. 2017;152(2):192-8.
22. Heijnsdijk EAM, de Carvalho TM, Auvinen A, Zappa M, Nelen V, Kwiatkowski M, et al. Cost-effectiveness of Prostate Cancer Screening: A Simulation Study Based on ERSPC Data. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(1):dju366.
23. Lansdorp-Vogelaar I, Gulati R, Mariotto AB, Schechter CB, de Carvalho TM, Knudsen AB, et al. Personalizing Age of Cancer Screening Cessation Based on Comorbidity: Model estimates of harms and benefits. *Annals of internal medicine*. 2014;161(2):104-12.
24. Lilja H, Cronin AM, Dahlin A, Manjer J, Nilsson PM, Eastham JA, et al. Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen at or before age 50. *Cancer*. 2011;117(6):1210-9.
25. Kawachi MH, Bahnson RR, Barry M, Busby JE, Carroll PR, Carter HB, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: prostate cancer early detection. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2010;8(2):240-62.
26. Wolf AM, Wender RC, Etzioni RB, Thompson IM, D'Amico AV, Volk RJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2010;60(2):70-98.
27. Carter HB, Albertsen PC, Barry MJ, Etzioni R, Freedland SJ, Greene KL, et al. Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *The Journal of urology*. 2013;190(2):419-26.
28. Horwich A, Parker C, de Reijke T, Kataja V. Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2013;24(suppl_6):vi106-vi114.
29. Walsh AL, Considine SW, Thomas AZ, Lynch TH, Manecksha RP. Digital rectal examination in primary care is important for early detection of prostate cancer: a retrospective cohort analysis study. *The British Journal of General Practice*. 2014;64(629):e783-7.
30. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European Urology*. 71(4):618-29.
31. Nam RK, Oliver TK, Vickers AJ, Thompson I, Kantoff PW, Parnes HL, et al. Prostate-Specific Antigen Test for Prostate Cancer Screening: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion. *Journal of Oncology Practice*. 2012;8(5):315-7.
32. Royce TJ, Hendrix LH, Stokes WA, Allen IM, Chen RC. Cancer screening rates in individuals with different life expectancies. *JAMA internal medicine*. 2014;174(10):1558-65.
33. Kilpeläinen TP, Tammela TLJ, Määttänen L, Kujala P, Stenman UH, Ala-Opas M, et al. False-positive screening results in the Finnish prostate cancer screening trial. *British Journal of Cancer*. 2010;102(3):469-74.
34. Bergdahl AG, Aus G, Lilja H, Hugosson J. Risk of dying from prostate cancer in men randomized to screening. *Cancer*. 2009;115(24):5672-9.
35. Boniol M, Autier P, Perrin P, Boyle P. Variation of Prostate-specific Antigen Value in Men and Risk of High-grade Prostate Cancer: Analysis of the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial Study. *Urology*. 2015;85(5):1117-22.
36. Gulati R, Inoue LYT, Gore JL, Katcher J, Etzioni R. Individualized Estimates of Overdiagnosis in Screen-Detected Prostate Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(2):djt367.
37. Vickers AJ, Sjoberg DD, Ulmert D, Vertosick E, Roobol MJ, Thompson I, et al. Empirical estimates of prostate cancer overdiagnosis by age and prostate-specific antigen. *BMC Medicine*. 2014;12:26-.

38. Stattin P, Vickers AJ, Sjöberg DD, Johansson R, Granfors T, Johansson M, et al. Improving the Specificity of Screening for Lethal Prostate Cancer Using Prostate-specific Antigen and a Panel of Kallikrein Markers: A Nested Case-Control Study. *Eur Urol*. 2015;68(2):207-13.
39. Crawford ED, Moul JW, Rove KO, Pettaway CA, Lamerato LE, Hughes A. Prostate-specific antigen 1.5-4.0 ng/mL: a diagnostic challenge and danger zone. *BJU international*. 2011;108(11):1743-9.
40. van Leeuwen PJ, Connolly D, Tammela TLJ, Auvinen A, Kranse R, Roobol MJ, et al. Balancing the harms and benefits of early detection of prostate cancer. *Cancer*. 2010;116(20):4857-65.
41. Potts JM, Lutz M, Walker E, Modlin C, Klein E. Trends in PSA, age and prostate cancer detection among black and white men from 1990-2006 at a tertiary care center. *Cancer*. 2010;116(16):3910-5.
42. Carter HB, Kettermann A, Ferrucci L, Landis P, Metter EJ. Prostate-Specific Antigen Velocity Risk Count Assessment: A New Concept for Detection of Life-Threatening Prostate Cancer During Window of Curability. *Urology*. 2007;70(4):685-90.
43. Loeb S, Sutherland DE, D'Amico AV, Roehl KA, Catalona WJ. PSA velocity is associated with gleason score in radical prostatectomy specimen: marker for prostate cancer aggressiveness. *Urology*. 2008;72(5):1116-20; discussion 20.
44. Wolters T, Roobol MJ, Bangma CH, Schroder FH. Is prostate-specific antigen velocity selective for clinically significant prostate cancer in screening? European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (Rotterdam). *Eur Urol*. 2009;55(2):385-92.
45. Loeb S, Metter EJ, Kan D, Roehl KA, Catalona WJ. Prostate-Specific Antigen Velocity Risk Count Improves the Specificity of Screening for Clinically Significant Prostate Cancer. *BJU international*. 2012;109(4):508-14.
46. Huang M, Lin Y, Xu A, Uhlman M, Deng X, Lin X, et al. Percent free prostate-specific antigen does not improve the effectiveness of prostate cancer detection in Chinese men with a prostate-specific antigen of 2.5-20.0 ng/ml: a multicenter study. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2014;31(4):925.
47. Liang Y, Ankerst DP, Ketchum NS, Ercole B, Shah G, Shaughnessy JD, et al. Prospective Evaluation of Operating Characteristics of Prostate Cancer Detection Biomarkers. *The Journal of urology*. 2011;185(1):104-10.
48. Kitagawa Y, Ueno S, Izumi K, Kadono Y, Konaka H, Mizokami A, et al. Cumulative probability of prostate cancer detection in biopsy according to free/total PSA ratio in men with total PSA levels of 2.1-10.0 ng/ml at population screening. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2014;140(1):53-9.
49. Pepe P, Aragona F. Incidence of insignificant prostate cancer using free/total PSA: results of a case-finding protocol on 14,453 patients. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2010;13(4):316-9.
50. Faria EF, Carvalhal GF, dos Reis RB, Tobias-Machado M, Vieira RA, Reis LO, et al. Use of low free to total PSA ratio in prostate cancer screening: detection rates, clinical and pathological findings in Brazilian men with serum PSA levels <4.0 ng/mL. *BJU international*. 2012;110(11 Pt B):E653-7.
51. Stephan C, Vincendeau S, Houlgatte A, Cammann H, Jung K, Semjonow A. Multicenter Evaluation of [-2]Proprostate-Specific Antigen and the Prostate Health Index for Detecting Prostate Cancer. *Clinical Chemistry*. 2013;59(1):306.
52. Loeb S, Sanda MG, Broyles DL, Shin SS, Bangma CH, Wei JT, et al. The prostate health index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *The Journal of urology*. 2015;193(4):1163-9.
53. Tosoian JJ, Druskin SC, Andreas D, Mullane P, Chappidi M, Joo S, et al. Prostate Health Index density improves detection of clinically significant prostate cancer. *BJU international*. 2017;120(6):793-8.
54. Heidegger I, Klocker H, Pichler R, Horninger W, Bektic J. PSA Isoforms' Velocities for Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Anticancer research*. 2015;35(6):3567-70.
55. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, Blase A, Mathis J, Aubin SM, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology*. 2007;69(3):532-5.

56. Haese A, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol.* 2008;54(5):1081-8.
57. Crawford ED, Rove KO, Trabulsi EJ, Qian J, Drewnowska KP, Kaminetsky JC, et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases. *The Journal of urology.* 2012;188(5):1726-31.
58. Deras IL, Aubin SM, Blase A, Day JR, Koo S, Partin AW, et al. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *The Journal of urology.* 2008;179(4):1587-92.
59. Chun FK, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PFA, et al. Prostate Cancer Gene 3 (PCA3): Development and Internal Validation of a Novel Biopsy Nomogram. *European Urology.* 56(4):659-68.
60. Wei JT, Feng Z, Partin AW, Brown E, Thompson I, Sokoll L, et al. Can urinary PCA3 supplement PSA in the early detection of prostate cancer? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2014;32(36):4066-72.
61. Birnbaum JK, Feng Z, Gulati R, Fan J, Lotan Y, Wei JT, et al. Projecting Benefits and Harms of Novel Cancer Screening Biomarkers: A Study of PCA3 and Prostate Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2015;24(4):677-82.
62. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, Hofer MD, Paris PL, Simko J, et al. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *The American journal of surgical pathology.* 2007;31(6):882-8.
63. Mosquera JM, Mehra R, Regan MM, Perner S, Genega EM, Bueti G, et al. Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2009;15(14):4706-11.
64. Tomlins SA, Aubin SM, Siddiqui J, Lonigro RJ, Sefton-Miller L, Miick S, et al. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Science translational medicine.* 2011;3(94):94ra72.
65. Sanda MG, Feng Z, Howard DH, Tomlins SA, Sokoll LJ, Chan DW, et al. Association Between Combined TMPRSS2:ERG and PCA3 RNA Urinary Testing and Detection of Aggressive Prostate Cancer. *JAMA oncology.* 2017;3(8):1085-93.
66. Leyten GH, Hessels D, Smit FP, Jannink SA, de Jong H, Melchers WJ, et al. Identification of a Candidate Gene Panel for the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2015;21(13):3061-70.
67. Yan C, Kim YH, Kang HW, Seo SP, Jeong P, Lee IS, et al. Urinary Nucleic Acid TSPAN13-to-S100A9 Ratio as a Diagnostic Marker in Prostate Cancer. *Journal of Korean Medical Science.* 2015;30(12):1784-92.
68. Katafigioti A, Katafigiotis I, Sfoungaristos S, Alamanis C, Stravodimos K, Anastasiou I, et al. In the search of novel urine biomarkers for the early diagnosis of prostate cancer. Intracellular or secreted proteins as the target group? Where and how to search for possible biomarkers useful in the everyday clinical practice. *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica.* 2016;88(3):195-200.
69. Murray NP, Reyes E, Fuentealba C, Jacob O. Efficacy of Using Sequential Primary Circulating Prostate Cell Detection for Initial Prostate Biopsy in Men Suspected of Prostate Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP.* 2016;17(7):3385-90.
70. Murray NP, Reyes E, Fuentealba C, Orellana N, Jacob O. Primary circulating prostate cells are not detected in men with low grade small volume prostate cancer. *Journal of oncology.* 2014;2014:612674.
71. Murray NP, Reyes E, Badinez L, Orellana N, Fuentealba C, Olivares R, et al. Circulating Prostate Cells Found in Men with Benign Prostate Disease Are P504S Negative: Clinical Implications. *Journal of oncology.* 2013;2013:165014.

72. Sharova E, Grassi A, Marcer A, Ruggero K, Pinto F, Bassi P, et al. A circulating miRNA assay as a first-line test for prostate cancer screening. *Br J Cancer*. 2016;114(12):1362-6.
73. Daniel R, Wu Q, Williams V, Clark G, Guruli G, Zehner Z. A Panel of MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers for the Identification of Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(6).
74. Kotb S, Mosharafa A, Essawi M, Hassan H, Meshref A, Morsy A. Circulating miRNAs 21 and 221 as biomarkers for early diagnosis of prostate cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(12):12613-7.
75. Guzel E, Karatas OF, Semercioz A, Ekici S, Aykan S, Yentur S, et al. Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(4):875-9.
76. Schutz E, Akbari MR, Beck J, Urnovitz H, Zhang WW, Bornemann-Kolatzki K, et al. Chromosomal instability in cell-free DNA is a serum biomarker for prostate cancer. *Clin Chem*. 2015;61(1):239-48.
77. Gordian E, Ramachandran K, Reis IM, Manoharan M, Soloway MS, Singal R. Serum free circulating DNA is a useful biomarker to distinguish benign versus malignant prostate disease. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(8):1984-91.
78. Feng J, Gang F, Li X, Jin T, Houbao H, Yu C, et al. Plasma cell-free DNA and its DNA integrity as biomarker to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate-specific antigen. *International urology and nephrology*. 2013;45(4):1023-8.
79. Barry KH, Moore LE, Sampson JN, Koutros S, Yan L, Meyer A, et al. Prospective study of DNA methylation at chromosome 8q24 in peripheral blood and prostate cancer risk. *Br J Cancer*. 2017;116(11):1470-9.
80. Steiner I, Jung K, Schatz P, Horns T, Wittschieber D, Lein M, et al. Gene promoter methylation and its potential relevance in early prostate cancer diagnosis. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2010;77(5):260-6.
81. Pipinikas CP, Carter ND, Corbishley CM, Fenske CD. HIF-1 α mRNA gene expression levels in improved diagnosis of early stages of prostate cancer. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2008;13(7):680-91.
82. Basu S, Majumder S, Bhowal A, Ghosh A, Naskar S, Nandy S, et al. A Study of Molecular Signals Deregulating Mismatch Repair Genes in Prostate Cancer Compared to Benign Prostatic Hyperplasia. *PLoS ONE*. 2015;10(5).
83. Klein RJ, Hallden C, Gupta A, Savage CJ, Dahlin A, Bjartell A, et al. Evaluation of multiple risk-associated single nucleotide polymorphisms versus prostate-specific antigen at baseline to predict prostate cancer in unscreened men. *Eur Urol*. 2012;61(3):471-7.
84. Liss MA, Xu J, Chen H, Kader AK. Prostate genetic score (PGS-33) is independently associated with risk of prostate cancer in the PLCO trial. *The Prostate*. 2015;75(12):1322-8.
85. Pashayan N, Duffy SW, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Martin RM, et al. Implications of polygenic risk-stratified screening for prostate cancer on overdiagnosis. *Genetics in Medicine*. 2015;17(10):789-95.
86. Altintas DM. Differentially Expressed Androgen-Regulated Genes in Androgen-Sensitive Tissues Reveal Potential Biomarkers of Early Prostate Cancer. 2013;8(6).
87. Bryant RJ, Sjoberg DD, Vickers AJ, Robinson MC, Kumar R, Marsden L, et al. Predicting high-grade cancer at ten-core prostate biopsy using four kallikrein markers measured in blood in the ProtecT study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(7).
88. Parekh DJ, Punnen S, Sjoberg DD, Asroff SW, Bailen JL, Cochran JS, et al. A Multi-institutional Prospective Trial in the USA Confirms that the 4Kscore Accurately Identifies Men with High-grade Prostate Cancer. *European Urology*. 2015;68(3):464-70.

89. Schostak M, Schwall GP, Poznanovic S, Groebe K, Muller M, Messinger D, et al. Annexin A3 in urine: a highly specific noninvasive marker for prostate cancer early detection. *The Journal of urology*. 2009;181(1):343-53.
90. Pina F, Botelho F, Lopes T, Lopes I, Figueiredo G, Portugal R, et al. Can serum angiogenin be used to improve the diagnostic performance in prostate cancer screening? *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 2014;23(3):166-72.
91. Balan V, Wang Y, Nangia-Makker P, Kho D, Bajaj M, Smith D, et al. Galectin-3: a possible complementary marker to the PSA blood test. *Oncotarget*. 2013;4(4):542-9.
92. Khan S, Jutzy JM, Valenzuela MM, Turay D, Aspe JR, Ashok A, et al. Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e46737.
93. Nunes J, Naymark M, Sauer L, Muhammad A, Keun H, Sturge J, et al. Circulating sphingosine-1-phosphate and erythrocyte sphingosine kinase-1 activity as novel biomarkers for early prostate cancer detection. *Br J Cancer*. 2012;106(5):909-15.
94. Tavoosidana G, Ronquist G, Darmanis S, Yan J, Carlsson L, Wu D, et al. Multiple recognition assay reveals prostasomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(21):8809-14.
95. Ankerst DP, Liss M, Zapata D, Hoefler J, Thompson IM, Leach RJ. A case control study of sarcosine as an early prostate cancer detection biomarker. *BMC Urology*. 2015;15(1):99.
96. Gkotsos G, Virgiliou C, Lagoudaki I, Sardeli C, Raikos N, Theodoridis G, et al. The Role of Sarcosine, Uracil, and Kynurenic Acid Metabolism in Urine for Diagnosis and Progression Monitoring of Prostate Cancer. *Metabolites*. 2017;7(1).
97. Casadio V, Calistri D, Salvi S, Gunelli R, Carretta E, Amadori D, et al. Urine cell-free DNA integrity as a marker for early prostate cancer diagnosis: a pilot study. *BioMed research international*. 2013;2013:270457.
98. Medina EA, Shi X, Grayson MH, Ankerst DP, Livi CB, Medina MV, et al. The diagnostic value of adiponectin multimers in healthy men undergoing screening for prostate cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2014;23(2):309-15.
99. Salvi S, Gurioli G, Martignano F, Foca F, Gunelli R, Cicchetti G, et al. Urine Cell-Free DNA Integrity Analysis for Early Detection of Prostate Cancer Patients. *Disease markers*. 2015;2015:574120.
100. Jefferies MT, Pope CS, Kynaston HG, Clarke AR, Martin RM, Adams JC. Analysis of Fascin-1 in Relation to Gleason Risk Classification and Nuclear ETS-Related Gene Status of Human Prostate Carcinomas: An Immunohistochemical Study of Clinically Annotated Tumours From the Wales Cancer Bank. *Biomarkers in cancer*. 2017;9:1179299x17710944.